

17 Баумуратов А.С., Кононов А.В., Ли В.В., Зинченко В.П. (2003) // Горизонты биофизики: от теории к практике. Под ред. Иванецкого Г.Р., Пушино, стр. 141-147.

18 Касымов В.А., Барышников С.Г., Зинченко В.П. (2003) // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». Пушино, стр. 71-74.

УДК 612.75:574.6

М. А. Сарсенова*, Т. Д. Укбаева

Евразийский национальный университет им. Л. Н. Гумилева г. Астана, Казахстан

*e-mail: sarsenova_madina93@mail.ru

Мезенхимальные стволовые клетки: культивирование и применение в регенеративной медицине

В данной работе рассматриваются особенности выделения и культивирования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга. Дается характеристика их свойств и функций в процессе культивирования, а также возможности их использования в регенеративной медицине.

Ключевые слова: мезенхимальные стволые клетки, костный мозг, культивирование, регенеративная медицина

М. А. Сарсенова, Т. Д. Укбаева

Мезенхималық діңгекті жасушалар: культивациясы және регенерациялық медицинада қолдану тәсілі

Бұл жұмыста мезенхималық діңгекті жасушалардың сүйек майынан бөлінуі, олардың культивация кезіндегі сипаттамалары және регенерациялық медицинада қолдану мүмкіндіктері қарастырылған.

Түйін сөздер: мезенхималық діңгекті жасушалар, сүйек майы, культивация, регенерациялық медицина

M. A. Sarsenova, T. D. Ukbayeva

Mesenchymal Stem Cells: cultivating and using in regenerative medicine

The features of isolation and cultivation of mesenchymal stem cells (MSCs) of the bone marrow are discussed in this article. There are the characteristic features and functions of MSCs during the cultivation and using them in regenerative medicine.

Keywords: mesenchymal stem cells, bone marrow, cultivation, regenerative medicine

В настоящее время широко используются методы клеточной биотехнологии в трансплантологии при лечении различных повреждений органов и тканей. Особое значение уделяется стволовым клеткам (СК), которые приобрели свою известность благодаря своим регенеративным свойствам.

Стволовыми называют клетки, самоподдерживающиеся в течение всей жизни организма и способные к дальнейшей дифференцировке в клетки разных типов. Многие из них не исчезают в онтогенезе.

В тканях млекопитающих и человека имеется несколько сот типов СК [1]. Например, тотипотентными (могут дать развитие целого организма) являются зигота и бластомеры. Некоторые авторы не считают их СК, т.к. после деления они исчезают (однако не все), давая на стадии бластоцисты плюрипотентные эмбриональные СК (ЭСК). ЭСК имеют неограниченный пролиферативный потенциал и на стадии гастролы генерируют во все типы мультипотентных СК эмбриона и взрослого организма. При симметричном делении ЭСК производят себе подобные и не имеют специализации. При асимметричном митозе одна клетка остается СК, другая – родоначальной, прогениторной клеткой (ПК), способной быстро делиться симметрично, давая себе подобные, и имеет ограниченный пролиферативный потенциал. Деления ПК заканчиваются образованием монопотентных СК - клеток-предшественников (К-П), способных к развитию только в один тип дифференцированных клеток. Их объединяет одна функция - обеспечение самообновления организма в течение всей жизни.

Монопотентными являются СК костного мозга – главный источник взрослых гемопоэтических клеток, образующих один клеточный тип: эритроциты, моноциты и т.д. Эти СК обладают ограниченным пролиферативным потенциалом и пополняются за счет предыдущих СК. Взрослый костный мозг содержит также мезенхимальные СК (МСК), которые способствуют обновлению мезенхимальных тканей, таких как кость, хрящ, мышцы, связки и др.

Среди СК наиболее перспективными, с позиции применения для клеточной терапии, считаются, вышеуказанные мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга человека.

К общим свойствам мезенхимальных стволовых клеток относят: способность к симметричному и асимметричному делению, высокий пролиферационный потенциал, высокая способность к адгезии, фибробластоподобная морфология, образование колоний в культуре, легко индуцируемая дифференцировка. Первоначально изучавшиеся в связи с их ведущей ролью в формировании гематопоетического микроокружения стромальные стволовые клетки костного мозга, впоследствии оказались в центре внимания с выявлением у них неожиданного дифференцировочного потенциала. Так, была установлена их идентичность со стволовыми клетками костной системы. Затем стало известно, что МСК костного мозга способны дифференцироваться в клетки костной (остеобласты), хрящевой (хондроциты), сухожильной (фибробласты), жировой (адипоциты), мышечной (миобласт и кардиомиоцитоподобные клетки) тканей и нервной тканей [2-5]. На сегодняшний день установлены следующие маркеры, экспрессируемые мезенхимальными стволовыми клетками: SH-2, SH-3, SH-4, STRO-1, Sca-1, Thy-1, CD44, CD29, CD71, CD106, CD120a, CD124. Маркеры CD34, CD45 не экспрессируются, что отличает МСК от гематопоетических стволовых клеток. МСК формируют достаточно динамичную систему в костном мозге, состоящую из дифференцированных фибробластов, ретикулярных клеток, эндотелия, компонентов экстрацеллюлярного матрикса, цитокинов. При этом взаимодействие между собой и с другими клетками осуществляется через специфические рецепторы и молекулы адгезии [6].

Выделение и культивирование МСК относительно несложно, но существует проблема получения однородной клеточной популяции мезенхимальных стволовых клеток в достаточном количестве для трансплантации и консервации впрок. По известным методикам выращивания МСК из костного мозга обычно получают гетерогенные популяции клеток стромы с незначительным содержанием в них стволовых клеток. В работе с МСК используют традиционные методики работы с клетками, в каждом случае подбирая индивидуальную последовательность действий, условия выделения и наработки клеточной массы.

МСК реально получают из донорского, аутологичного или фетального (плод – 9-12 недель) материала. МСК из донорского костного мозга могут быть заготовлены заранее, как и из фетального. МСК (клеточную культуру после наработки клеточной массы) хранят путем криоконсервации. Аутологичные клетки имеют преимущество, т.к. представляют собой фракцию высокоочищенных собственных стволовых клеток. Выращенные в культуральной среде аутологичные мезенхимальные стволовые клетки при введении больному безопасны, т.к. это собственные клетки, благодаря чему исключается возможность аллергических реакций. Большое количество вводимых клеток дает выраженный лечебный эффект. Хотя аутогенные клетки предпочтительны, у них есть ограничения: клетки от тяжелобольных и от очень пожилых людей обладают низкой способностью к пролиферации и самообновлению.

Наилучшим материалом для наработки трансплантантных МСК является фетальный материал, т.к. клетки обладают выраженной способностью к дифференцировке, более активны функционально, обладают большим потенциалом пролиферации и роста, продуцируют факторы регенерации и роста; при пересадке они стимулируют ангиогенез. Однако использование фетальных клеток связано с этическими проблемами и с труднодоступностью исходного материала.

Известен способ получения МСК для имплантации с целью направленной остеорегенерации. Была выращена гомогенная (не менее 80%) популяция плюрипотентных МСК, полученных путем дезагрегации ткани-источника МСК с последующим ресуспендированием суспензии и культивированием на ростовой среде. Недостатком метода является получение в результате гетерогенной популяции недифференцированных МСК.

Известен способ получения МСК, основанный на способности клеток прикрепляться к поверхности посуды, в которой выращивают культуру клеток. В процессе используют бычью эмбриональную сыворотку (ее отобраные лоты). Были получены клетки с высокой адгезивной способностью, скоростью пролиферации и временем сохранения мультипотентности. К недостаткам этого способа относится трудоемкость анализа бычьей сыворотки, применяемой для выращивания клеток, но главное - плохая воспроизводимость метода, из-за чего наблюдается большой разброс результатов получения МСК.

Известен способ получения МСК из костного мозга человека, по которому выделяли моноклеарные клетки путем центрифугирования с последующей селекцией на антитела к поверхностному антигену CD 105⁺, экспрессирующемуся на поверхности МСК. Клетки отбирали по

адгезии МСК на пластике, затем осуществляли их культивирование. В результате была выделена фракция клеток CD 105⁺, обогащенная МСК. Выход клеток не был высоким, а способ оказался достаточно затратным.

Клеточная масса, полученная из костного мозга реципиента, содержит (в пунктате) не более 1-3% стволовых клеток, т.е. клеток с полипотентными свойствами, а основную часть пунктата при заборе составляет периферическая кровь. Из-за этого необходимы методики наработки однородной по фенотипу массы МСК, пригодной для использования в медицинских целях, выращенной в необходимых для лечения количествах (80-100 млн. клеток на процедуру), полученной с минимумом затрат времени и финансов, с минимальным травмированием реципиента [7].

Т. о., можно заключить, что каждая методика имеет свои преимущества и недостатки, и экспериментатор должен комбинировать различные методики в зависимости от поставленных целей.

Что касается данных о перспективах клинического применения мезенхимальных стволовых клеток, то они выглядят достаточно оптимистично. Предпринимаются попытки использования аутологичных костномозговых мультипотентных мезенхимальных клеток-предшественников для лечения дегенеративных поражений суставов. Проводятся первые клинические испытания применения культивируемых мезенхимальных прогениторных клеток в терапии сложных переломов кости [8].

Продолжается совершенствование методик генетической модификации донорских мезенхимальных стволовых клеток с целью коррекции генетических дефектов стромальных тканей. Предполагается, что уже в ближайшее время мезенхимальные клетки-предшественники будут использоваться в неврологии для направленной химеризации клеток мозга и создания здорового пула клеток, способного генерировать дефицитный фермент или фактор, ответственный за клинические проявления заболевания.

Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток может использоваться для восстановления стромы костного мозга у онкологических больных после радио- и химиотерапии, а в сочетании с костномозговыми клетками — для восстановления гемопоэза. Развитию заместительной терапии, направленной на устранение дефектов опорно-двигательного аппарата с помощью МСК, способствуют инженерные разработки в области конструирования матричных биоматериалов, формирующих каркасы, заселяемые потомством мезенхимальных стволовых клеток [9-10].

Особое значение имеет применение этих методов при лечении обширных поверхностных и глубоких ожогов, существуют многообещающие экспериментальные данные результатов активных исследований, указывающие на возможность клинического применения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга с целью коррекции патологии центральной нервной и сердечно-сосудистой систем.

Литература

- 1 Лосева Е.В. Нейротрансплантация фетальных тканей и компенсаторно-восстановительные процессы в ЦНС реципиентов // Успехи физиол.наук. - 2001. - №1. - С.19-37.
- 2 Bianco, P., Costantini, M., Dearden, L.C. et al. Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow // Br J Haematol. – 1988. - №68. - 401-403.
- 3 Kopen, G.C., Prockop, D.J., Phinney, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains // Proc Natl Acad Sci USA. – 1999. - №96. - 10711-10716.
- 4 Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro // J Clin Invest. – 1999. - №103. - 697-705.
- 5 Weiss, L. Haemopoiesis in mammalian bone marrow // Ciba Found Symp. - 1981. - №84. - 5-21.
- 6 Cheng, L. et al. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture // Stem Cells. – 2003. - №21. - 131-142.
- 7 Патент РФ №230363 «Способ получения мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга млекопитающих и популяция мезенхимальных стволовых клеток, полученная этим способом».
- 8 Репин В.С. Эмбриональная стволовая клетка // Успехи физиол.наук. - 2001. Т.32. - №1. - С.3-18.
- 9 Сухих Г.Т., Малайцев В.В. Нейральная стволовая клетка: биология и перспективы нейротрансплантации // Бюллетень эксп. биол.и мед.- 2001. - Т.131. - №3. - С.244-255.
- 10 Wexler, S.A. et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not // Br J Haematol. -2003. - №121. - 368-374